

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 14 日 (14.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/087765 A1(51) 国際特許分類⁷: C07K 17/14, C12N 11/14, B01J
31/38, 35/02, A61L 2/16, G01N 33/543, 33/547, 33/553,
A61K 47/48, 47/02, 33/00, 41/00市 小倉北区中島 2 丁目 1 番 1 号 東陶機器株式会社
内 Fukuoka (JP). 大神 有美 (OGAMI, Yumi) [JP/JP]; 〒
802-8601 福岡県 北九州市 小倉北区中島 2 丁目 1 番
1 号 東陶機器株式会社内 Fukuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004638

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 31 日 (31.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

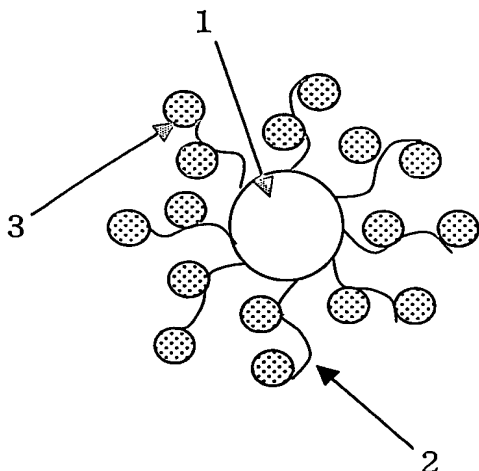
(30) 優先権データ:
特願2003-94429 2003 年 3 月 31 日 (31.03.2003) JP
特願2003-340234 2003 年 9 月 30 日 (30.09.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東陶機
器株式会社 (TOTO LTD.) [JP/JP]; 〒802-8601 福岡県
北九州市 小倉北区中島 2 丁目 1 番 1 号 Fukuoka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 曾根崎 修司
(SONEZAKI, Shuji) [JP/JP]; 〒802-8601 福岡県 北九州市
市 小倉北区中島 2 丁目 1 番 1 号 東陶機器株式会
社内 Fukuoka (JP). 金平 幸輝 (KANEHIRA, Koki) [JP/JP];
〒802-8601 福岡県 北九州市 小倉北区中島 2 丁目
1 番 1 号 東陶機器株式会社内 Fukuoka (JP). 八木 晋
一 (YAGI, Shinichi) [JP/JP]; 〒802-8601 福岡県 北九州(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).添付公開書類:
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TITANIUM DIOXIDE COMPLEX HAVING MOLECULE DISTINGUISHABILITY

(54) 発明の名称: 分子識別能を有する二酸化チタン複合体

(57) Abstract: A titanium dioxide complex capable of distinguishing
molecules is obtained by modifying the surface of a fine titanium dioxide
particle with a hydrophilic polymer in such a manner that titanium diox-
ide is bonded via an ester bond to a carboxyl group of the hydrophilic
polymer and immobilizing a molecule having an ability to specifically
bind to a target molecule to the carboxyl residue of the hydrophilic poly-
mer. Due to the molecule distinguishability, this titanium dioxide com-
plex can bind specifically to an endocrine disrupting chemical, a patho-
genic factor, a cancer cell, etc. and decompose the same by a photocat-
alytic function.(57) 要約: 二酸化チタン微粒子表面が親水性高分子により修飾
され、該親水性高分子のカルボキシル基と二酸化チタンはエス
テル結合で結合しているとともに、前記親水性高分子のカルボ
キシル残基に目的分子に対して特異的な結合能を有する分子を
固定化して、分子識別能を有する二酸化チタン複合体を得る。
この二酸化チタン複合体は、分子識別能によって内分泌攪乱物
質、病因分子、ガン細胞等と特異的に結合し、かつ光触媒作用
によりそれらを分解可能である。

WO 2004/087765 A1

分子識別能を有する二酸化チタン複合体

5 技術分野

本発明は、内分泌攪乱物質、あるいは病因分子やガン細胞などに対して特異的な結合能を有する分子を固定化し、紫外線の照射などによってこれらの物質、分子、細胞の分解作用を示す、分子識別能を有する二酸化チタン複合体に関する。

10

背景技術

近年、内分泌攪乱物質の分子識別能を有するDNAなどの生体分子を支持体上に固定化し、それにより選択的結合性を付与した材料が環境浄化材として提案されている（例えば、特開2001-81098号公報参照）。また、
15 アナターゼ型二酸化チタンには光触媒作用があり、その強い酸化力により微生物、汚れ、悪臭物質等の有機物を分解することが知られている。特に、内分泌攪乱物質のような難分解性の物質に対しても強力な分解作用を示すことから、環境浄化に有効であると期待されている（例えば、Y. Ohko ら：Environmental Science and Technology, 35, 2365-2368 (2001) 参照）。さ
20 らに、現在では二酸化チタンと活性炭やゼオライトなどの無機吸着剤を複合化することにより、二酸化チタンの分解効率を高めるような工夫がなされている（例えば特開平01-189322号公報参照）。二酸化チタンの表面処理においても、パラジウムなどの還元反応促進触媒金属を二酸化チタン等の光触媒表面に析出させることで、光触媒の酸化、還元反応を促進すること

が考案されている（例えば、特開昭 6 0 - 1 4 9 4 0 号公報参照）。

しかしながら、DNA 等による内分泌攪乱物質の選択的結合材料については、結合させた内分泌攪乱物質等の確実な除去や分解手段が無く、かつ吸着飽和の問題から浄化能力にも限界がある。また、前記の二酸化チタンの光触媒としての能力を高めようとする考案についても、特定物質の結合や分解を指向していない。したがって、例えば内分泌攪乱物質のみと選択的に結合し分解することは不可能であった。このように環境浄化の分野では、目的の物質のみを識別して選択的に結合し、これを光触媒の強い酸化力によって分解する、すなわち二酸化チタンによる「分子識別能と光触媒能との組合せ」技術は知られていない。

一方、近年医療分野における新しい薬剤投与形態として、体内または体表面で薬剤が経時的に徐放されるように設計されたシステム（ドラッグデリバリーシステム：DDS）が注目されている。これは、既存医薬品の薬効を最大限に高めると共に、その副作用を最小限に制御しようとするものである。

DDS における薬剤の担体としては、非分解性高分子やアミノ酸ポリマー（例えば、特開平 0 9 - 2 5 5 5 9 0 号公報）、リポソーム（例えば、特開 2 0 0 3 - 2 2 6 6 3 8 号公報参照）、およびタンパク質中空ナノ粒子（例えば、特開 2 0 0 3 - 2 8 6 1 9 8 号公報参照）等が盛んに研究されている。

DDS の概念をさらに進展させたものに、標的指向（ターゲティング）DDS がある。これは薬剤を必要な部位に、必要な量を、必要な時間に送り込むシステムであり、最終的には病巣を確実に狙い撃ちするミサイルドラッグ（ミサイル療法）を目標としている。

ミサイルドラッグの場合、DDS 担体にリガンドを担持させ、標的細胞表面に存在する受容体に特異的に認識・結合させることによりターゲティング

を行う。このような能動的ターゲティングの標的となる受容体に対応するリガンドとしては、抗原、抗体、ペプチド、糖脂質や糖タンパク質などが挙げられる。これらの中で、糖脂質や糖タンパク質の糖鎖は細胞の増殖や分化、組織の発生や形態形成、生体防御や受精機構、あるいはガン化とその転移等の細胞間コミュニケーションにおける情報分子として重要な役割を果たしていることが近年明らかになりつつある（例えば、N. Yamazaki ら：Advanced Drug Delivery Review, 43, 225-244 (2000) 参照）。

このような DDS に、強い光触媒分解能を有する二酸化チタンを応用しようとする試みがなされている（N. Yamazaki ら：Advanced Drug Delivery Review, 43, 225-244 (2000)、特開 2002-316950 号公報、R. Cai ら：Cancer Research, 52, 2346-2348 (1992) 参照）。これは、標的とするガン細胞に二酸化チタンを担持した金などの金属粒子を撃ち込んで取り込ませた後、紫外線等の光を照射してガン細胞を死滅させようとするものである。二酸化チタンは、大気中や溶液中でも極めて安定な物質であり、かつ（遮光された）動物体内では毒性もなく安全なことが知られている。しかも、二酸化チタンの活性化を光のオン・オフで制御することが可能なため、ガン治療に向けての DDS への応用が期待される。

しかしながら、二酸化チタンの等電点は pH 6 前後であり、中性付近の生理的条件下では二酸化チタン粒子が凝集してしまう問題点がある。このため、二酸化チタン自体を直接血管内に投与したり、そのままで DDS の担体として用いることは不可能であった。また二酸化チタン表面に、前記リガンド等の選択的結合能を有する分子を固定化する技術も知られておらず、二酸化チタンの DDS としての実用化は現状では困難な状況にある。すなわち、医療分野においても二酸化チタンによる「分子識別能と光触媒能との組合せ」技

術は、上記問題点のために未だ開発されていない。

発明の開示

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行い、二酸化チタン微
5 粒子表面を親水性高分子で修飾した後、さらに目的分子に対して特異的な結合能を有する分子を固定化した二酸化チタン複合体が、分子識別能と光触媒能を両立できることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明の分子識別能を有する二酸化チタン複合体は、二酸化チタン微粒子表面が親水性高分子により修飾され、該親水性高分子のカルボキシル基と二酸化チタンはエステル結合で結合しているとともに、前記親水性
10 高分子のカルボキシル残基に目的分子に対して特異的な結合能を有する分子を固定化したものである。この方法により、光触媒作用を有する二酸化チタン粒子に、抗体などの特異的な結合能を有する分子を導入することが可能となり、分子識別能を有する二酸化チタン複合体を製造することができる。

15 結果として得られた分子識別能を有する二酸化チタン複合体は、内分泌攪乱物質、病因分子、ガン細胞等に対する分子識別能を有し、かつ光触媒作用によりこれら物質の分解反応を示す、分子識別能を有する二酸化チタン複合体を提供する。本複合体は、水または水溶液中で目的とする分子を特異的に識別捕捉し、紫外線照射などによりこれを強力に分解する能力を有する。特
20 に、本複合体が有する水系溶媒中で使用できる、目的分子を正確に識別捕捉できる、かつ強力な光触媒能を示す等の特性は、例えば水系の内分泌攪乱物質を始めとする有害物質の分解処理、あるいは特定の病因分子やガン細胞の破壊などの医療分野への応用に極めて有用である。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の分子識別能を有する二酸化チタン複合体を示す模式図である。

図 2 は、本発明の抗 α -フェトプロテイン抗体固定化二酸化チタン複合体
5 による、抗原（ α -フェトプロテイン）の分解活性を示す図である。抗原の分解活性は、吸光度の減少として表示されている。

図 3 は、本発明の抗ヒト血清アルブミン抗体固定化二酸化チタン複合体と
10 抗原（ヒト血清アルブミン）との結合性を、表面プラズモン共鳴法で評価した結果を示す図である。対照として、ストレプトアビジン固定化二酸化チタン複合体を用いた。

図 4 は、本発明の抗ヒト血清アルブミン抗体固定化二酸化チタン複合体に
よる、抗原（ヒト血清アルブミン）の分解活性の結果を示す図である。抗原の分解活性は、分解に伴う抗原の抗体との結合量の低下（表面プラズモン共鳴法で測定）から算出した分解率（％）で表示されている。対照として、ス
15 トレプトアビジン固定化二酸化チタン複合体を用いた。

発明を実施するための最良の形態

本発明の実施の形態を図面に基づいて具体的に説明する。図 1 は本発明の分子識別能を有する二酸化チタン複合体を示す模式図である。すなわち、本
20 発明の分子識別能を有する二酸化チタン複合体は、二酸化チタン微粒子 1 と、カルボキシル基を複数有する親水性高分子 2 をジメチルホルムアミドに分散させて 90 ～ 180℃で 1 ～ 12 時間水熱反応を行って両者をエステル結合で結合させた後、親水性高分子 2 のカルボキシル残基に目的分子に対して特異的な結合能を有する分子 3 を固定化させたものである。ここで、二酸

化チタンと親水性高分子とがエステル結合するのは、粒子表面の酸化チタンが反応系中の水に水和されてその表面に水酸基が生成し、その水酸基と親水性高分子のカルボキシル基とが反応してエステル結合を形成することによるものである。エステル結合の確認方法としては種々の分析方法が適用できるが、例えば赤外分光法によりエステル結合の吸収帯である $1700 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ 付近の赤外吸収の有無で確認することが可能である。また、特異的な結合能を有する分子 3 の固定化には、主にこの分子 3 が有するアミノ基が用いられる。また、アミノ基の無い分子であっても適切な修飾方法によりアミノ基を導入することは可能であり、あるいはアミノ基以外のカルボキシル基と反応性のある所望の官能基や架橋を導入することも可能である。

本発明で用いる二酸化チタン微粒子 1 としては、凝集性の問題や癌治療用として体内への適用の場合など、その使用形態の自由度の観点から分散粒径が $2 \sim 200 \text{ nm}$ であることが望ましい。さらに、本発明で用いる二酸化チタンとしては、アナターゼ型およびルチル型のいずれも好適に使用可能である。これは、結晶系の異なる二酸化チタンであってもその化学的性質はほぼ同一であり、いずれの結晶系であっても水溶性高分子による修飾、および特異的な結合能を有する分子を固定化することが可能であるためである。例えば、ガン細胞を破壊するためには光触媒活性の強いアナターゼ型を選択するなど、用途に応じて所望の結晶系の二酸化チタンを選択し使用することができる。

さらに、二酸化チタンが少なくとも粒子表面の一部に存在すれば、例えば磁性材と二酸化チタンとの複合材のようなものであっても、粒子表面の二酸化チタンの特性は近似しているため、カルボキシル基を介した特異的な結合能を有する分子の固定化は可能である。したがって、磁性材と二酸化チタンと

の複合材であっても単一の二酸化チタン粒子の場合と全く同様の方法により、分子識別能を有する二酸化チタン複合体を製造することが可能である。

本発明で用いる親水性高分子 2 としては、本二酸化チタン複合体を水溶液中に分散した状態で使用することを想定しているため、水溶性高分子であることが望ましい。本発明で用いる水溶性高分子としては、複数のカルボキシル基を有する高分子であればいずれも適用可能であるが、例えばカルボキシメチルデンプン、カルボキシメチルデキストラン、カルボキシメチルセルロース、ポリカルボン酸類、およびカルボキシル基単位を有する共重合体（コポリマー）などが挙げられる。具体的には、水溶性高分子の加水分解性および溶解度の観点から、ポリアクリル酸、ポリマレイン酸等のポリカルボン酸類、およびアクリル酸／マレイン酸やアクリル酸／スルホン酸系モノマーの共重合体（コポリマー）がより好適に使用される。これらの親水性高分子により二酸化チタンを修飾することにより、親水性高分子のカルボキシル残基に所望の特異的な結合能を有する分子 3 を固定化することが可能となる。

さらに、分子 3 の固定化後においても残余のカルボキシル基間の電気的斥力により、本発明の二酸化チタン複合体は中性付近を含む広範囲の pH 領域で均一に分散した状態を維持できる。

本発明において、二酸化チタン複合体に分子識別能を付与する、特異的な結合能を有する分子 3 としては、目的分子と特異的に結合する分子であれば下記に限定されるものではない。このような分子間の特異的な結合は、生体内においては多種多様なものが明らかとなっている。これらの中で、最も重要な分子としてタンパク質が挙げられる。本発明によれば、タンパク質として抗体、リガンド、レセプター、ポリ・オリゴペプチド、さらにはアミノ酸まで好適に固定化が可能である。また、単純タンパク質の二酸化チタン複合

体への固定化にはアミノ基およびチオール基を、糖タンパク質の場合では糖のアルデヒド基を、固定化の際の標的官能基とすることが可能である。また、水溶性高分子により修飾した二酸化チタンのカルボキシル基にビオチン（または、アビジン）を導入しておき、タンパク質をアビジン（または、ビオチン）と架橋させることにより、ビオチン：アビジンの相互作用を利用して固定化することも可能である。

さらに、本発明の二酸化チタン複合体は粒子表面に特定の因子やリガンドを提示することが可能である。したがって、例えば特定の受容体を発現しているガン細胞のような細胞に対して、リガンド：受容体の特異的な結合により本複合体を細胞に導入することが可能である。これらの因子やリガンドとしては、上皮成長因子（EGF）、トランスフォーミング増殖因子、血小板由来増殖因子、骨形成因子、神経成長因子等の増殖・成長因子や形成因子の他に、インターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子、エリスロポエチン、Fas抗原、アクチビン等のホルモンやリガンド等が挙げられる。これらのタンパク質も上記と同様に固定化が可能である。

すなわち、これらに対応する受容体の特異的に発現している特定細胞に対して、ターゲティング可能なミサイルドラッグを構築することが可能となる。

近年、特定のタンパク質と特異的に結合する核酸アプタマーが注目されている。このようなアプタマーも、本発明の分子識別能を付与する特異的な結合性を有する分子3として利用が可能である。核酸の固定化を行う場合には、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）によるDNA増幅の際に、アミノ化プライマー、ビオチン化プライマー、チオール化プライマーを用いて修飾DNAを合成することにより、同様の方法で修飾二酸化チタン上へ固定化することが可能である。例えば、アミノ化DNAを固定化に用いる場合、

あらかじめ修飾二酸化チタンのカルボキシル基にN-ヒドロキシこはく酸イミド(NHS)のようなエステルを導入し、求核置換反応によりアミノ化DNAを修飾二酸化チタンへ共有結合させることが可能である。チオール化DNAを用いる場合も、カルボキシル基にNHSを反応させた後に2-(2-ピリジニルジチオ)エタンアミンを作用させることにより、同様にチオール化DNAを修飾二酸化チタン上へ固定化することが可能である。

被固定化分子のアルデヒド基を用いる場合は、カルボキシル基にNHSを反応させた後に、ヒドラジンを用いることにより被固定化分子を修飾二酸化チタンに結合し、シアノホウ素化ナトリウムで還元すれば良い。この他、ピオチンヒドラジドやアミノ化ピオチンを用いてカルボキシル基をピオチン化させておけば、容易にアビジン化した被固定化分子を修飾二酸化チタン上に導入できる。このように適宜、試薬、修飾および架橋の方法を選択すれば、修飾二酸化チタン上に導入したカルボキシル残基に多種多様な特異的な結合能を有する分子3を、容易に固定化することが可能である。

15 以上のように、修飾二酸化チタン上に導入したカルボキシル残基と結合可能な官能基を有し、かつその結合手法が明らかであれば、特異的な結合能を有する分子(3)としてタンパク質や核酸あるいは糖類の他にも、脂質や各種生理活性物質等を好適に利用することが可能である。

20 一方、本発明の分子識別能を有する二酸化チタン複合体を水系の有害物質処理や、医薬あるいは医療に応用しようとする場合では生体内の生理的条件から、中性の水系溶媒に均一に分散していることが要求される。上述したように、本発明の分子識別能を有する二酸化チタン複合体は残余のカルボキシル残基を有しているため、水系溶媒中ではカルボキシル基の負電荷に由来する斥力が複合体間に作用する。そのため、pH3~13の広範囲のpH領域

における水溶液中でも、本複合体は凝集することなく均一に分散した状態を維持することが可能である。したがって、本発明の分子識別能を有する二酸化チタン複合体を水、種々のpH緩衝液、輸液、あるいは生理食塩水に分散させた、均一で安定な分散液を提供することが可能となる。また、本分散液

5 を含む軟膏やスプレー剤等も製造が可能である。この特性は、特に二酸化チタンを体内外のDDSに応用する際に極めて有用である。すなわち、本発明の分子識別能を有する二酸化チタン複合体の分散液は中性付近の生理的条件下においても凝集することがないために、患部組織に直接注射したり静脈に注射してターゲティングを行うことが可能となる。また、本分散液を含む軟

10 膏やスプレー剤を皮膚等の患部に直接塗布し、太陽光や紫外線ランプ等により光治療を施すことが可能となる。

さらに、本発明の分子識別能を有する二酸化チタン複合体は単独でDDSとして利用可能であることは無論のこと、DDSの一形態として他のキャリア中に包括させて利用することも可能である。この場合のキャリアとしては

15 特に制限はないが、リボソーム、ウイルス粒子、中空ナノ粒子等を好適に用いることができる。

本発明の分子識別能を有する二酸化チタン複合体を励起、活性化させるための光源装置は特別である必要はないが、二酸化チタンのバンドギャップの関係上その波長は400nm以下であることが望ましい。皮膚等の外用用途

20 では、太陽光や通常の紫外線ランプ、あるいはブラックライトを好適に使用できる。また、体内の患部に対しては内視鏡に紫外線ファイバーを装着することにより紫外線を照射すれば良い。さらに、特に280nm付近の紫外線を局所的に患部に照射して病変部を破壊しようとする光療法を想定した場合では、その作用増強剤として本発明の分子識別能を有する二酸化チタン複

合体を適用することも可能である。

以下に、本発明を実施例に従って詳細に説明する。ただし、本発明はこの実施例に制限されるものではない。

(実施例 1)

5 二酸化チタン粒子へのポリアクリル酸の導入

チタンテトライソプロポキシド 3.6 g とイソプロパノール 3.6 g を混合し、氷冷下で 60 ml の超純水に滴下して加水分解を行った。滴下後に室温で 30 分間攪拌した。攪拌後、12 N 硝酸を 1 ml 滴下して、80℃で 8 時間攪拌を行い、ペプチゼーションした。ペプチゼーション終了後、0.4
10 5 μm のフィルターで濾過し、脱塩カラム (PD10; アマシャム ファルマシア バイオサイエンス社) を用いて溶液交換して固形成分 1% のアナターゼ型二酸化チタンゾルを調製した。この分散液を 100 ml 容のバイアル瓶に入れ、200 Hz で 30 分間超音波処理を行った。超音波処理を行う前と後での平均分散粒径はそれぞれ、36.4 nm、20.2 nm であった。

15 超音波処理後、溶液を濃縮して固形成分 20% の二酸化チタンゾル (アナターゼ型) を調製した。

得られた二酸化チタンゾル 0.75 ml を 20 ml のジメチルホルムアミド (DMF) に分散させ、ポリアクリル酸 (平均分子量: 5000、和光純薬) 0.2 g を溶解した DMF を 10 ml 添加後、攪拌して混合した。水熱
20 反応容器に溶液を移し変え、180℃で 6 時間水熱合成を行った。反応終了後、反応容器温度が 50℃以下になるまで冷却し、溶液を取り出した後に水 80 ml を添加して攪拌混合した。エバポレータで DMF および水を除去した後に、再度、水 20 ml を添加してポリアクリル酸修飾二酸化チタン水溶液とした。2 N 塩酸 1 ml を添加して二酸化チタン粒子を沈殿させて、遠心

後に上清を除去することにより未反応のポリアクリル酸を分離した。再度水を添加して洗浄を行い、遠心後に水を除去した。50 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）を10 ml添加後、200 Hzで30分間超音波処理を行い、二酸化チタン粒子を分散させた。超音波処理後、0.45 μ mのフィルターで
5 濾過し、固形成分1.5%のポリアクリル酸修飾二酸化チタンゾルを得た。
作製したポリアクリル酸修飾二酸化チタン微粒子（アナターゼ型）の分散粒径を測定したところ、45.5 nmであった。

（実施例2）

ポリアクリル酸修飾二酸化チタン微粒子への抗AFP抗体分子の固定化
10 実施例1により得たポリアクリル酸修飾二酸化チタンゾル（アナターゼ型）1 mlを脱塩カラムPD10を用いて溶液交換を行い、水に分散したポリアクリル酸修飾二酸化チタンゾル3 mlを得た。この溶液1.5 mlに、200 mMの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと50 mMのN-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）の混合液0.
15 1 mlを添加して10分間攪拌を行い、カルボキシル基を活性化した。攪拌終了後、10 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）で平衡化したPD10を用いて溶液交換し、10 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）に分散したカルボキシル基活性化ポリアクリル酸修飾二酸化チタンゾル3 mlを得た。同一の緩衝液で調製した抗 α -フェトプロテイン（抗AFP）ポリクローナル抗体（ヤギIgG、SC-8108；コスモバイオ社）を0.05 mg/mlになるよう
20 に添加した。室温で15分間攪拌後、0.5 Mになるようにエタノールアミン塩酸塩水溶液（pH 8.5）を添加した。10分間攪拌後、2 N塩酸を1 ml添加して二酸化チタン粒子を沈殿させ、遠心後に上清を除去した。再度水を添加して洗浄を行い、遠心後に水を除去した。50 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）を10 ml添加後、200 Hzで30分間超音波処理を行い、二酸化チタン粒子を分散させた。超音波処理後、0.45 μ mのフィルターで濾過し、固形成分1.5%のポリアクリル酸修飾二酸化チタンゾルを得た。

H 7. 0) を 2. 5 m l 添加した後、2 0 0 H z で 3 0 分間超音波処理を行い、二酸化チタン粒子を分散させた。超音波処理後、0. 4 5 μ m のフィルターで濾過し、固形成分 0. 3 % の抗 A F P 抗体固定化二酸化チタン複合体ゾルとした。作製した抗 A F P 抗体固定化二酸化チタン複合体（アナターゼ型）の分散粒径を測定したところ、5 2. 8 n m であった。

（実施例 3）

ポリアクリル酸修飾二酸化チタン微粒子への抗 H S A 抗体分子の固定化

実施例 1 により得たポリアクリル酸修飾二酸化チタンゾル（アナターゼ型）1 m l を脱塩カラム P D 1 0 を用いて溶液交換を行い、水に分散したポリアクリル酸修飾二酸化チタンゾル 3 m l を得た。この溶液 1. 5 m l に 2 0 0 m M の 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドと 5 0 m M の N - ヒドロキシコハク酸イミド (N H S) の混合液 0. 1 m l を添加して 1 0 分間攪拌を行い、カルボキシル基を活性化した。攪拌終了後、1 0 m M 酢酸緩衝液 (p H 5. 0) で平衡化した P D 1 0 を用いて溶液交換し、1 0 m M 酢酸緩衝液 (p H 5. 0) に分散したカルボキシル基活性化ポリアクリル酸修飾二酸化チタンゾル 3 m l を得た。同一の緩衝液で調製した抗ヒト血清アルブミン (抗 H S A) モノクローナル抗体 (マウス I g G、M S U - 3 0 4 ; コスモバイオ社) を 0. 0 5 m g / m l になるように添加した。室温で 1 5 分間攪拌後、0. 5 M になるようにエタノールアミン塩酸塩水溶液 (p H 8. 5) を添加した。1 0 分間攪拌後、2. 5 M の N a C l、2 0 % (w / v) ポリエチレングリコールを等量添加し二酸化チタン粒子を沈殿させ、遠心後に上清を除去した。再度水を添加して洗浄を行い、遠心後に水を除去した。P B S 緩衝液 (p H 7. 0 : 1 0 0 m M の N a C l を含む、日本ジーン) を 2. 5 m l 添加し、二酸化チタン粒子を分散させた。

0.45 μ mのフィルターで濾過し、固形成分0.3%の抗HSA抗体固定化二酸化チタン複合体ゾルとした。作製した抗HSA抗体固定化二酸化チタン複合体（アナターゼ型）の分散粒径を測定したところ、52.8 nmであった。

5 （実施例4）

ポリアクリル酸修飾二酸化チタン微粒子へのストレプトアビジン分子の固定化

実施例1により得たポリアクリル酸修飾二酸化チタンゾル（アナターゼ型）1 mlを脱塩カラムPD10を用いて溶液交換を行い、水に分散したポ
10 リアクリル酸修飾二酸化チタンゾル3 mlを得た。この溶液1.5 mlに200 mMの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと50 mMのN-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）の混合液0.1 mlを添加して10分間攪拌を行い、カルボキシル基を活性化した。攪拌終了後、10 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）で平衡化したPD10を用いて溶液
15 交換し、10 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）に分散したカルボキシル基活性化ポリアクリル酸修飾二酸化チタンゾル3 mlを得た。ストレプトアビジン（Pierce Biotechnology Inc.コード：21126）を0.05 mg/mlになるように添加した。室温で15分間攪拌後、0.5 Mになるようにエタノールアミン塩酸塩水溶液（pH 8.5）を添加
20 した。10分間攪拌後、2.5 MのNaCl、20%（w/v）ポリエチレングリコールを等量添加し二酸化チタン粒子を沈殿させ、遠心後に上清を除去した。再度水を添加して洗浄を行い、遠心後に水を除去した。PBS緩衝液（pH 7.0、日本ジーン）を2.5 ml添加し、二酸化チタン粒子を分散させた。0.45 μ mのフィルターで濾過し、固形成分0.3%のストレ

プトアビジン固定化二酸化チタン複合体ゾルとした。作製したストレプトアビジン固定化二酸化チタン複合体（アナターゼ型）の分散粒径を測定したところ、 50.5 nm であった。

（実施例 5）

5 ポリアクリル酸修飾磁性材複合二酸化チタン微粒子の合成

セパラブルフラスコ内にポリオキシエチレン（15）セチルエーテル（C-15；日本サーファクタント工業社）を 45.16 g を溶解させ、5分間窒素置換した後、シクロヘキセン溶液（和光純薬） 75 ml を添加、 0.67 M の FeCl_2 （和光純薬）水溶液 3.6 ml を添加し、 250 rpm で
10 攪拌しながら、30%アンモニア水溶液 5.4 ml を添加し、1時間反応させた。その後、 50 mM テトラエチルオルソシリケート水溶液（和光純薬）を 0.4 ml 滴下し、1時間反応させた。その後、チタンテトライソプロポキシド（和光純薬）を最終濃度 0.005 M になるように加えた。 50% （w/v）エタノール水溶液 10 ml を 1 ml ずつ、10分間隔で添加し
15 た。この反応液を遠心分離し、沈殿物を 350°C で2時間焼成した。焼成後、 10 mM 硝酸水溶液に分散させ、超音波処理後、 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターでろ過した。得られた磁性材：複合二酸化チタンゾル 0.75 ml を 20 ml のジメチルホルムアミド（DMF）に分散させ、ポリアクリル酸（平均分子量： 5000 、和光純薬） 0.3 g を溶解したDMF 10 ml を添加後、攪
20 拌して混合した。水熱反応容器（HU-50、三愛科学）に溶液を移し換え、 180°C で6時間合成を行った。反応終了後、反応容器温度が 50°C 以下になるまで冷却し、分液漏斗に溶液を取り出した後、水 10 ml を添加して攪拌混合した。次いで、クロロホルムを 40 ml 加え攪拌混合して下層を除去し、上層を回収した。このステップを2回繰り返し、DMFを除去した。こ

の溶液 10 ml に 10 ml の 1.5 M の NaCl、20% (w/v) ポリエチレングリコール 6000 (和光純薬) を加え、遠心後に上澄を除去した。沈殿に 2.5 ml の水を加え、Sephadex G-25 カラムによりゲルろ過を行いポリアクリル酸修飾磁性材複合二酸化チタン微粒子 (アナターゼ型) の分散液を得た。

(実施例 6)

ポリアクリル酸修飾磁性材複合二酸化チタン微粒子への抗 HSA 抗体分子の固定化

実施例 5 で得られたポリアクリル酸修飾磁性材複合二酸化チタン微粒子の分散液 1.5 ml に 200 mM の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドと 50 mM の N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) の混合液 0.1 ml を添加して 10 分間攪拌を行い、カルボキシル基を活性化した。攪拌終了後、10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した PD10 を用いて溶液交換し、10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に分散したカルボキシル基活性化ポリアクリル酸修飾磁性材複合二酸化チタンゾル 3 ml を得た。同一の緩衝液で調製した抗ヒト血清アルブミン (抗 HSA) モノクローナル抗体 (マウス IgG: MSU-304、コスモバイオ社) を 0.05 mg/ml になるように添加した。室温で 15 分間攪拌後、0.5 M になるようにエタノールアミン塩酸塩水溶液 (pH 8.5) を添加した。10 分間攪拌後、2.5 M の NaCl、20% (w/v) ポリエチレングリコールを等量添加して磁性材複合二酸化チタン粒子を沈殿させ、遠心後に上清を除去した。再度水を添加して洗浄を行い、遠心後に水を除去した。PBS (日本ジーン) を 2.5 ml 添加し、磁性材複合二酸化チタン粒子を分散させた。0.45 μ m のフィルターで濾過し、固形成分 0.3% の抗 HSA

抗体固定化磁性材複合二酸化チタン複合体ゾルとした。作製した抗HSA抗体固定化磁性材複合二酸化チタン複合体（アナターゼ型）の分散粒径を測定したところ、105nmであった。

（実施例7）

5 二酸化チタン粒子へのアクリル酸／スルホン酸系共重合体の導入

実施例1で得られた固形成分20%の二酸化チタンゾル（アナターゼ型）0.75mlを20mlのジメチルホルムアミド（DMF）に分散させ、アクリル酸／スルホン酸系モノマー共重合体（平均分子量：5000、プロトン置換後凍結乾燥した標品、日本触媒）0.3gを溶解したDMF10mlを添加後、攪拌して混合した。水熱反応容器（HU-50、三愛科学）に溶液を移し、150℃で5時間反応させた。反応終了後、反応容器を室温になるまで冷却し、反応液に対して2倍量のイソプロパノール（和光純薬）を添加した。室温で30分以上静置後、4000×g、20分間遠心分離を行い、沈殿物を回収した。この沈殿物を70%エタノールで洗浄後、2.5mlの水を加えて、アクリル酸／スルホン酸系共重合体修飾二酸化チタンゾル（アナターゼ型）を得た。

（実施例8）

アクリル酸／スルホン酸系共重合体修飾二酸化チタン微粒子への抗DR4抗体分子の固定化

20 実施例7で作製したアクリル酸／スルホン酸系共重合体修飾二酸化チタンゾル1.5mlに200mMの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと50mMのN-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）の混合液0.1mlを添加して10分間攪拌を行い、カルボキシル基を活性化した。攪拌終了後、10mM酢酸緩衝液（pH5.0）で平衡化した

P D 1 0 を用いて溶液交換し、1 0 m M 酢酸緩衝液 (p H 5 . 0) に分散したカルボキシル基活性化アクリル酸／スルホン酸系共重合体修飾二酸化チタンゾル 3 m l を得た。これに、抗 D R 4 モノクローナル抗体 (A n t i - T R A I L R e c e p t o r 1 、マウス、コード：S A - 2 2 5 、フナコ
5 シ社) を 0 . 0 5 m g / m l になるように添加した。室温で 1 分間攪拌後、0 . 5 M になるようにエタノールアミン塩酸塩水溶液 (p H 8 . 5) を添加した。室温で 1 0 分間攪拌後、2 . 5 M の N a C l 、2 0 % (w / v) ポリエチレングリコールを等量添加して二酸化チタン粒子を沈殿させ、遠心分離により上清を除去した。水で洗浄の後遠心分離して沈殿を回収し、P B S 緩
10 衝液 (p H 7 . 0 、日本ジーン) を 2 . 5 m l 添加して二酸化チタン粒子を分散させた。0 . 4 5 μ m のフィルターで濾過し、固形成分 0 . 3 % の抗 D R 4 抗体固定化二酸化チタン複合体ゾル (アナターゼ型) を得た。

(実施例 9)

抗 A F P 抗体固定化二酸化チタン複合体による抗原 A F P の分解

15 α -フェトプロテイン (A F P 、コスモバイオ社) を 1 μ g / m l になるように 5 0 m M の P B S 緩衝液 (p H 7 . 0 、日本ジーン) で希釈し、実施例 2 で作製した抗 A F P 抗体固定化二酸化チタン複合体を固形成分 0 . 0 1 % になるように添加した。次いで、3 7 $^{\circ}$ C で 3 時間静置して抗原抗体反応による凝集体を形成させた。A F P と抗 A F P 抗体固定化二酸化チタン複
20 合体が凝集体を形成したことから、抗 A F P 抗体固定化二酸化チタン複合体が特異的に A F P を認識して結合していることは明らかである。この凝集体を攪拌しながら波長 3 4 0 n m の紫外光を 1 m W / c m ² になるように照射し、6 0 0 n m における波長の吸収 (凝集体の濁度) を分光光度計により測定した。結果を図 2 に示す。紫外線 (U V) 照射時にのみ、凝集体濃度の低

下にもなう吸光度の減少が認められる。すなわち、抗AFP抗体固定化二酸化チタン複合体の光触媒作用により、抗原AFPが分解されることが明らかとなった。

(実施例10)

5 抗HSA抗体固定化二酸化チタン複合体による抗原-抗体反応の確認

ヒト血清アルブミン(HSA、コスモバイオ社)を $250\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように 50mM のPBS緩衝液($\text{pH}7.0$ 、日本ジーン)で希釈した。別途、 400mM の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと 100mM のN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)の混合
10 液で表面プラズモン共鳴センサのセンサチップC1(BIACORE社)を活性化した。このセンサチップを表面プラズモン共鳴測定装置:BIACORE1000(BIACORE社)に装着し、先のHSA溶液を流速 $10\mu\text{l}/\text{min}$ で通液した後、 0.1M エタノールアミンにより活性基のブロッキングを行い、HSA固定化センサチップを作製した。このHSA固定化セ
15 ンサチップへ実施例3で作製した 0.01% の抗HSA抗体固定化二酸化チタン複合体ゾル、および実施例4で作製した 0.01% のストレプトアビジン固定化二酸化チタン複合体ゾルを送液して抗原-抗体反応を確認した。結果を図3に示す。HSA固定化センサチップに対し、抗HSA抗体固定化二酸化チタン複合体は反応してチップに結合しているが、ストレプトアビジン
20 固定化二酸化チタン複合体は反応せず結合は起こらなかった。すなわち、二酸化チタン上の親水性高分子に固定化された抗HSAモノクローナル抗体は、固定化後も抗体としての活性を確実に保持していることが確認された。

(実施例11)

抗HSA抗体固定化二酸化チタン複合体による抗原HSAの分解

HSAを20 ng/mlになるようにPBS緩衝液(pH 7.0、日本ジーン)で希釈し、実施例3で作製した抗HSA抗体固定化二酸化チタン複合体を固形成分0.01%になるように添加した。次いで、室温で30分放置後、波長340 nmの紫外光を1 mW/cm²になるように照射し、15分毎にサンプリングを90分間行った。実施例4で作製したストレプトアビジン固定化二酸化チタン複合体についても同様の処理を行った。別途、実施例8の方法に準じて、表面プラズモン共鳴測定用の抗HSAポリクローナル抗体(ウサギ)固定化センサチップを作製した。実施例8と同様にBIACORE 1000を用い、各経時サンプルを抗HSA抗体固定化センサチップに20 µl送液し、次いで2次抗体として抗HSAポリクローナル抗体(ウサギ)50 µg/mlを10 µl送液してサンドイッチアッセイを行い、抗体送液後10秒後のRU値(結合量に相当)を測定した。UV未照射時のRU値を100%とした相対値から算出したHSAの分解率を図4に示す。図4の結果から、抗HSA抗体固定化二酸化チタン複合体はストレプトアビジン固定化二酸化チタン複合体と比べ、HSAの分解速度が極めて速いことが示された。

産業上の利用可能性

本発明により、内分泌攪乱物質、病因分子、ガン細胞等と特異的に結合し、かつ光触媒作用によりそれらの分解作用を示す、分子識別能を有する二酸化チタン複合体を提供することができる。

請求の範囲

1. 二酸化チタンの表面が、カルボキシル基を有する親水性高分子により修飾された二酸化チタン複合体であって、該親水性高分子のカルボキシル基
5 と二酸化チタンがエステル結合で結合しているとともに、該親水性高分子のカルボキシル残基に、目的分子に対して特異的な結合能を有する分子を固定化したことを特徴とする、分子識別能を有する二酸化チタン複合体。
2. 前記二酸化チタンが、アナターゼ型、またはルチル型である、請求項
10 1 に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。
3. 前記二酸化チタンの粒径が、2～200nmであることを特徴とする、請求項1または2に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。
- 15 4. 前記二酸化チタンが、二酸化チタンと磁性材とからなる複合二酸化チタンであることを特徴とする、請求項1～3いずれか一項に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。
5. 前記親水性高分子が、水溶性高分子であることを特徴とする、請求項
20 1～4のいずれか一項に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。
6. 前記水溶性高分子が、ポリカルボン酸を含むことを特徴とする、請求項5に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。

7. 前記水溶性高分子が、分子中に複数のカルボキシル基単位を有する共重合体を含むことを特徴とする、請求項5に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。

5 8. 前記目的分子に対して特異的な結合能を有する分子が、アミノ酸、ペプチド、単純タンパク質、複合タンパク質、および抗体であることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一項に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。

10 9. 前記目的分子に対して特異的な結合能を有する分子が、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、およびペプチド核酸であることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一項に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。

10. 前記目的分子に対して特異的な結合能を有する分子が、単糖、糖鎖、
15 多糖、および複合糖質であることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一項に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。

11. 前記目的分子に対して特異的な結合能を有する分子が、脂肪酸、脂肪酸誘導体、単純脂質、複合脂質であることを特徴とする、請求項1～7の
20 いずれか一項に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。

12. 前記目的分子に対して特異的な結合能を有する分子が、生理活性物質であることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一項に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体。

13. 生体への導入が許容される水溶液中に、請求項8～12のいずれか一項に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体を含むことを特徴とする、分子識別能を有する二酸化チタン複合体の分散液。

5

14. 前記水溶液がpH緩衝液であることを特徴とする、請求項13記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体の分散液。

15. 前記水溶液が生理食塩水であることを特徴とする、請求項13記載
10 の分子識別能を有する二酸化チタン複合体の分散液。

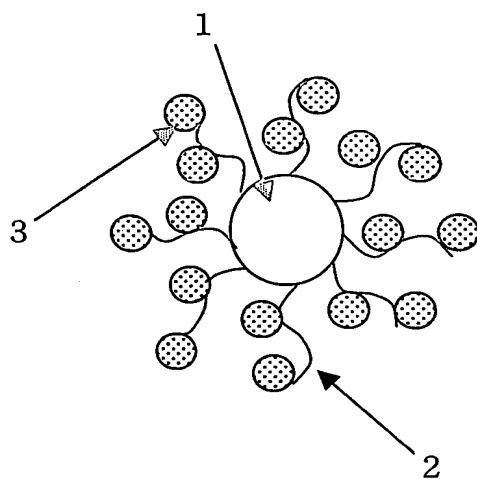
16. 生体への導入が許容される包括体に、該分子識別能を有する二酸化チタン複合体が包括されていることを特徴とする、請求項13～15のいずれか一項に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体の分散液。

15

17. 前記包括体が、リポソーム、ウイルス粒子、中空ナノ粒子のいずれかであることを特徴とする、請求項16に記載の分子識別能を有する二酸化チタン複合体の分散液。

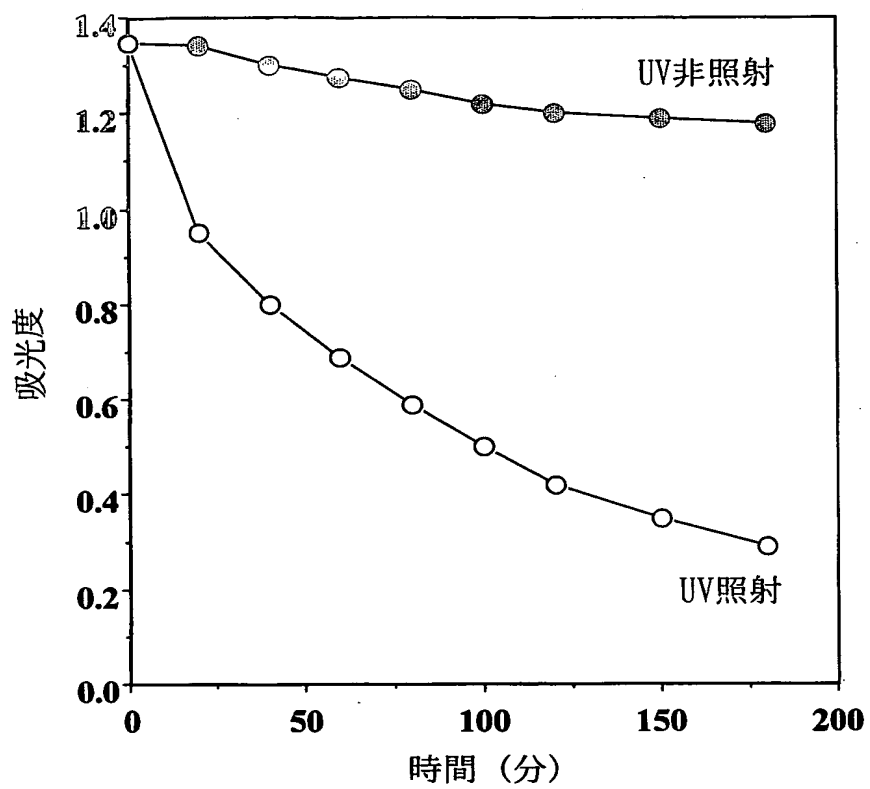
1 / 4

図 1



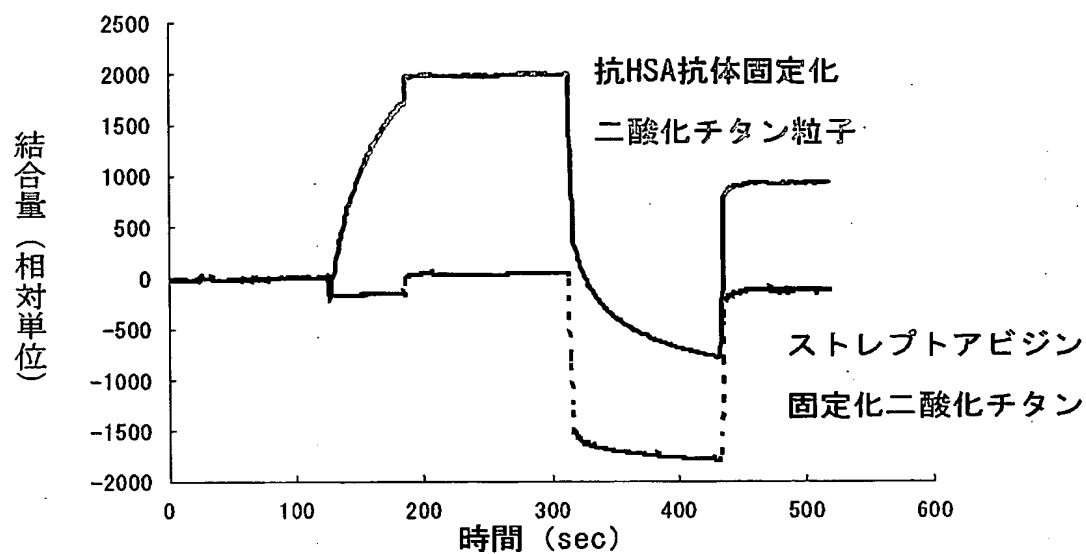
2 / 4

図 2



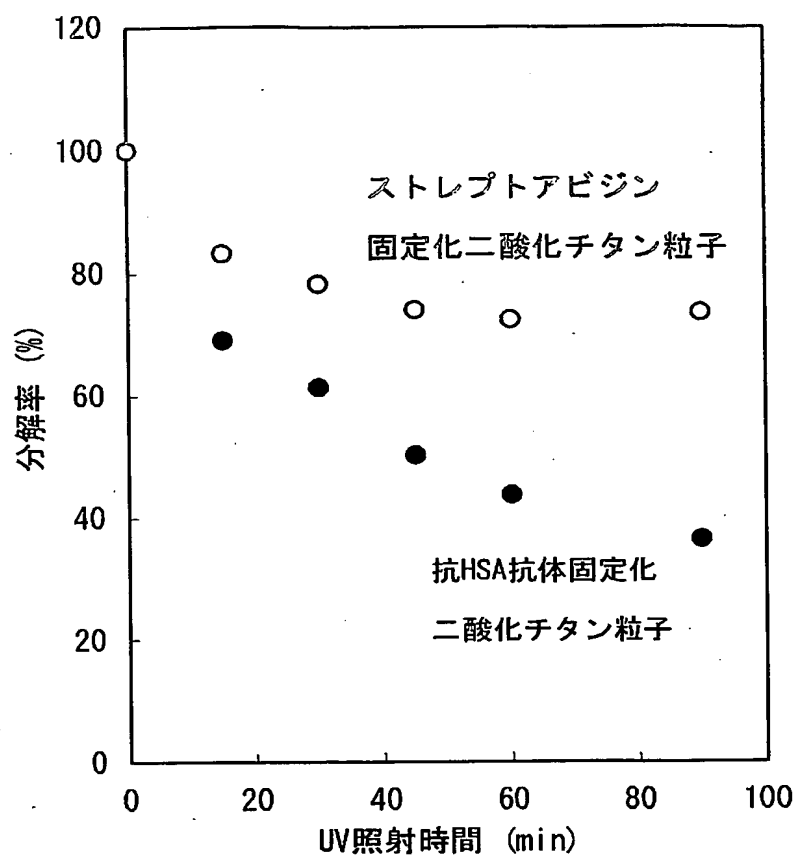
3 / 4

図 3



4 / 4

図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K17/14, C12N11/14, B01J31/38, B01J35/02, A61L2/16,
G01N33/543, G01N33/547, G01N33/553, A61K47/48, A61K47/02,
A61K33/00, A61K41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K17/14, C12N11/14, B01J31/38, B01J35/02, A61L2/16,
G01N33/543, G01N33/547, G01N33/553, A61K47/48, A61K47/02,
A61K33/00; A61K41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/033143 A1 (Noritake Co., Ltd.), 24 April, 2003 (24.04.03), & JP 2003-128502 A & JP 2003-117405 A & JP 2003-116987 A & JP 2003-116988 A	1-17
X	WO 03/033145 A1 (Noritake Co., Ltd.), 24 April, 2003 (24.04.03), & JP 2003-116534 A	1-17
X	WO 02/34301 A1 (Noritake Co., Ltd.), 02 May, 2002 (02.05.02), & AU 200192342 A & TW 508252 A & US 2003/0178296 A1 & KR 2003045111 A & ZA 200301462 A	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 July, 2004 (05.07.04)

Date of mailing of the international search report
20 July, 2004 (20.07.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

EXPRESS MAIL LABEL

NO.: EV 480461588 US

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004638

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 63-98384 A (Unitika Ltd.), 28 April, 1988 (28.04.88), (Family: none)	1-17
Y	JP 5-276945 A (Unitika Ltd.), 26 October, 1993 (26.10.93), (Family: none)	1-17
Y	JP 7-236690 A (Unitika Ltd.), 12 September, 1995 (12.09.95), (Family: none)	1-17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)